

포푸라 耐塩性 個體의 器內選抜

朴龍求* · 孫聖鎬** · 朴守貞*

慶北大學校 農科大學 林學科

In Vitro Selection for Salty Tolerance of Populus nigra × P. maximowiczii

Park, Young Goo* · Son, Sung Ho** · Park, Su Jeong*

*Dept. of Forestry, Coll. of Agri. Kyungpook Natl. Univ.

**Dept. of Forestry, Iowa State University, Ames, Iowa 50011-1021, U. S. A.

Summary

The concentration of 50 mM NaCl inhibited the shoot growth of *P. nigra × maximowiczii* in *in vitro* culture. The punctured leaves have produced so many individuals on MS basal medium with cytokinin. Especially MS basal medium with BAP 0.8mg/l showed the best shoot performance in which the average number of shoots were 127.6.

For selection of NaCl tolerance shoot of poplar, punctured leaves were inoculated on MS basal medium with BAP 0.8mg/l and various concentrations of NaCl(from 10 mM to 100 mM graded by 10 mM). On the medium with over 50mM of NaCl, 13.7 to 15.7 shoots were obtained. Especially on the medium with 50 mM and 100mM, 10.7 and 8.3 shoots, respectively. The shoots derived from control medium (non-NaCl) were depressed growth, while the selected shoots from MS with NaCl showed good growth performance on MS basal medium with 50 mM of NaCl.

From this results, we suggested that the possibility of *in vitro* selection to tolerance for inorganic salts in forest tree species.

緒 論

林木은 廣濶하고 多樣한 環境下에서 生育하고 있어서 유전적으로도 넓은 變異幅이 要求되고 있다. 人工植栽時 土壤 環境 變異가 深해서 適地適樹에 依한 樹種 選擇의 幅이 크게 제한 받기도 한다.

우리나라 西海岸 地域의 간척지는 400,000 ha 를 造成계획 중이며 1986년 50,000 ha를 造成한 바 있다 (Chae *et al.*, 1987). 그러나 이러한 간척지는 경작지로 사용하기 위해 脫塩하는데는 장시간을 要한다. 간척지 뿐만 아니라, 特殊 해안 林地에는 내염성이 높은 林木을 植栽하여 土壤을 탈염 시킬수 있을 뿐만 아니라, 삼림 造成을 위해서도 내염성이 높은 새로운 입목 품종개발 育成

이 必要하다.

林木에 對한 耐性 品種 育成은 野外實驗에 依해 選抜育成하는데 장기간이 걸리고 많은 경비가 소요되며 正確한 環境制御 등 어려운 점이 많다. 그러나 器內選抜法을 이용하면 ①野外보다 적절한 環境을 만들어 實驗할 수 있으므로 正確한 結果를 얻을 수 있고, ②單細胞나 Callus 및 胚의 大量增殖 클론 등과 같이 多樣한 組織에 對한 耐性檢定을 통하여 野外實驗과 平行 關係를 나타내는 조직을 밝혀 냄으로써 實驗期間을 크게 단축시킬 수 있다. ③實驗對象 組織이 野外個體보다 훨씬 작기 때문에 다루기 쉽고 內성에 對한 反應이 빨리 나타날 뿐만 아니라 ④작은 實驗空間에서도 많은 양의 材料를 다룰 수 있어서 經濟的이며 ⑤遺傳的으로 均一한 實驗材料를 使用하

로써 耐性에 대한 複雜한 機作을 밝혀낼 수 있다 (朴, 1986).

細胞培養이나 組織培養을 利用한 耐性選拔은 담배 (Binzel, 1985; Vanlerberghe, 1986), 벼 (Chae et al., 1987), *Triticum aestivum* (Epstein et al., 1979; McGuire, 1981), 양상치 (Shannon et al., 1983), 밀 (Gorham et al., 1986), 당근 (Ojima, 1983; Seeni et al., 1985) 등에서 報告된 바 있다.

그러나 林木에 對한 研究는 그 수가 매우 적어서 소나무 胚培養에 依한 耐塩性의 研究 (Park, 1984), 감귤나무 細胞培養에 依한 耐塩性 個體選拔 (Ben-Hayyim and Kochba, 1983)과 McCormick(1978)이 6개 수종에 對한 Aliminum 耐性을 調査 報告한 것에 불과하다.

本 研究는 林木에서 器內培養法을 利用한 耐塩性 個體選拔 可能性을 比較的 脫分化와 再分化가 쉬운 Poplar 수종을 선정하여 Model 實驗한 것이다.

實驗에 使用한 수종은 비교적 器內培養이 쉬운 포푸라 중에서 새로운 有望수종으로 주목 받고 있는 양황철나무를 대상으로 하여 遺傳的으로 균일한 材料를 얻기 위한 不定芽 誘導와 葉面을 針으로 자극한 組織에서의 大量增殖을 調査하였다. 또한 내염성이 높은 개체의 선발을 위하여 葉面을 針으로 자극한 후, NaCl의 濃度를 여러가지로 달리 첨가한 배지에서 개체를 誘導하여 耐塩性 個體選拔 可能性을 比較檢討하였다.

材料 및 方法

1) 不定芽 誘導 및 大量增殖

양황철나무의 健康한 野外個體의 1~2年生 가지를 3월에 採取하여 培養室內에서 側芽가 붙어 있는 部分을 3~4cm 길이로 잘라 70% 에칠 알콜에 1분간, 5% 차아염소산액에 3분간 소독후, 1% 과산화수소 용액에 3분간 消毒한 다음, 滅菌수로 2회 세척한 다음, 멸균수에 한시간 침적시켰다가 다시 3회 씻은후, BAP 0.2 mg/l, NAA 0.01 mg/l 를 添加한 1/2 MS 基本培地에 器內 挿木하여 不定芽의 生長을 도모하였다. 誘導된 줄기를 MS 基本培地에 BAP 0.01, 0.05, 0.10, 0.20, 0.40, 0.80, 1.00, 3.00과 5.00 mg/l 씩 添加한 배지에 移植하여 30일간 배양한 후 줄기의 증식 정도를 調査하여 大量增殖에 가장 좋은 培地를 탐색하였다. 發生

된 줄기는 다시 生長調節物質이 添加되지 않은 MS 基本培地에 옮겨서 生長을 도모하였다. 正常的인 生長을 보이는 줄기 및 完全히 전개된 잎을 조제하여 耐性 實驗에 使用하였다.

2) 針으로 자극한 葉表面 組織의 生長調節物質에 對한 反應

器內에서 不定芽 由來 줄기의 葉을 展開시켜 葉短徑이 16~21mm에 도달한 葉을 採取하여 針으로 한개 葉當 40~50個의 구멍을 뚫어서 MS 基本배지에 Auxin으로는 2,4-D, NAA, IBA, IAA의 4가지 종류를 각각 0.01, 0.05, 0.10, 0.50, 1.00, 1.50, 2.00, 2.50, 3.00, 3.50 mg/l 농도로 處理하였으며, Cytokinin으로써 BAP, Zip, Kinetin, Zeatin 4가지 種類를 0.1, 0.2, 0.4, 0.6, 0.8, 1.0, 2.0, 3.0, 4.0, 5.0 mg/l 로 添加한 배지를 만들어 이들 葉을 接種하였다. 이들 배지에 對해 葉表面을 위로 하고 밑면이 배지에 닿도록 처리해준 Abaxial 과 이와 반대로 처리한 Adaxial面에 對한 反應을 各各 調査하였다.

3) 針자극에 依한 葉表面에서 發生한 組織의 현미경적 調査

針으로 자극한 葉組織은 MS 基本培地에 가장 反應이 좋은 生長調節物質이 含有된 배지에 置床한 후 30일이 된 후 여러가지 發生段階의 組織을 3~5mm² 크기로 잘라 다음과 같은 과정을 거쳐 파라핀 절편을 만들었다.

FAA 液으로 固定한 후 12시간 뒤에 70% 에칠 알콜에 保管한 試料를 50% 에칠 알콜에 30분씩 두번 세척한 후 一般 脫水 過程에 따라 處理하였다. 脫水된 試料는 軟파라핀 (46~48°C)으로 浸透시킨 후 다시 硬파라핀 (56~58°C)으로 包埋한 뒤 台木에 固定시켜 회전식 마이크로톰으로 10μm의 連續切片을 만들어 卵白그리세린으로 도포한 슬라이드 위에 부착시켰다. 부착된 切片은 파라핀을 除去하기 위하여 一般의 方法인 알콜 처리를 하였으며, 헤마톡실린과 사프란으로 各各 染色한 후, 다시 脫水시켜 키시톨에 10~20분간 處理하여 透明化시킨 試料는 커버그라스로 덮어 Canada balsam으로 封入하여 60°C로 건조시킨 후 顯微鏡下에서 觀察하였다.

4) 器內 挿木苗에 對한 NaCl 濃度別 反應調査
不定芽로 부터 大量增殖된 줄기를 3.5cm 程度로 均一하게 조제하여 生長調節物質을 添加하지

않은 MS 基本培地에 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 100 mM의 NaCl을 添加하여 만든 培養培地에 接種하여 接種 4週後와 8週後에 生育狀態를 조사하였다.

5) 針으로 자극한 葉表面에서 NaCl 耐性 個體 選拔

葉表面을 針으로 자극한 試料를 BAP 0.8mg/l 가 添加된 MS 基本培地에 NaCl을 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 100 mM까지 10단계로 添加하여 만든 培地에 接種하여 接種後 4週와 8週後에 發生한 個體數를 調査하였다. 本 處理에서 發生한 個體를 NaCl에 對한 耐性 與否를 檢定하기 위해 처음 처리한 NaCl 농도보다 높은 濃度로 NaCl을 添加한 培地로 옮겨 4週後 生育狀態를 檢査하였다.

生長調節物質을 添加하지 않은 1/2 MS 基本培地에 葉面 針자극 처리에서 發生된 個體를 이식하여 接種後 1個月後에 發根 狀態를 調査하였다.

結果 및 考察

1) 不定芽 誘導 및 大量增殖

MS 基本培地에 BAP 0.2mg/l 와 NAA 0.1mg/l 를 添加하여 不定芽를 誘導한 후 成長시킨 줄기를 大量增殖시킨 結果는 表-1과 같다.

Table 1. Effect of BAP concentrations on *in vitro* shoot multiplication of *Populus nigra* × *maximowiczii* on MS basal medium after 30 days in culture

BAP concentrations (mg/l)	Mean number of multishoot (mean ±SD)
0.00	3.8 ± 2.28
0.01	4.4 ± 1.82
0.05	3.0 ± 1.58
0.10	14.4 ± 2.61
0.20	9.6 ± 4.22
0.40	6.4 ± 1.14
0.80	2.0 ± 2.55
1.00	1.2 ± 1.64
3.00	1.2 ± 1.30
5.00	2.2 ± 0.84

接種 1個月後 調査한 結果 BAP 0.1mg/l 에서 가장 많은 14.4개의 줄기 生長을 보였으며, 새로 發生한 줄기들은 活力이 강한 것들이었다. 여기서 나온 無菌枝莖는 正常的 葉의 展開를 促進시

키기 위해 生長調節物質이 添加되어 있지 않은 1/2 MS 基本培地에 옮겨주었다.

林木의 器內 大量增殖에 關한 報告는 포푸라류가 대부분인데 本 實驗材料인 양황철 역시 다른 포푸라류, 즉 이태리포푸라 (Park & Son, 1986), 현사시나무 (Park & Han, 1986) 등과 비슷한 結果를 나타내고 있다. 이태리 포푸라는 BAP 0.1 mg/l 에서 7배, 현사시나무는 BAP 0.4 mg/l 에서 5배의 증가율을 보였다. 그러나 아카시나무에서는 MS 基本培地에 BAP 1.0 mg/l 와 NAA 0.01 mg/l 를 添加한 배지에서 약 10.5배로 가장 좋은 反應을 보여서 Cytokinin 單獨 處理보다는 低濃度의 Auxin 添加가 더 큰 效果를 나타내고 있다 (Park & Woo, 1989).

2) 葉表面의 針자극에 對한 Auxin과 Cytokinin 의 添加效果

器內에서 增殖된 葉의 單徑이 16~21mm된 葉을 採取, 針으로 구멍을 뚫어서 MS 基本培地에 여러가지 種類와 濃度의 Auxin을 添加한 效果를 觀察한바 표-2와 같다.

2,4-D는 0.01mg/l 를 除外하고는 前處理중 9 가지 처리에서 Callus가 誘發되었으며, 0.1mg/l 添加區에서 2,303.0mg으로 가장 높은 生體重量을 보였고, 그 反應은 葉 뒷면이 培地에 接하도록 처리한 Abaxial side 배양에서 反應이 크게 나타났으며, 그 反對의 경우에는 2,4-D 2.5mg/l 添加에서 Callus무게 626.0mg으로 낮은 生長量을 나타냈다. Adaxial side 배양에서는 뿌리가 나온 것도 있으나, 0.1mg/l 에서와 같이 뿌리수가 2.0 개로 아주 낮은 發根力을 보였다. Chun등(1986)은 *Populus alba* × *grandidentata*에서는 Abaxial 과 Adaxial의 切斷面에서 再分化에 差異가 있음을 報告한 바 있다.

NAA 10개 處理區에서는 대부분이 發根을 보이고 있으며 0.5 mg/l 에서는 130.6개로 비교적 많은 수의 發根을 나타내고 있을 뿐만 아니라 2.0 mg/l 에서는 1,226.0mg의 높은 Callus 生長을 보이고 있다.

IAA는 낮은 濃度인 0.01mg/l 處理區에서는 反應이 없었으나 0.05부터 3.0mg/l 까지 9가지 처리구에서는 뿌리가 發生하였다. 가장 많은 뿌리가 發生한 것은 IAA 2.5mg/l 구에서 4.8개로 NAA 나 IBA 처리구에 비해 比較的 적은 수의 뿌리

Table 2. Effect of auxins on morphogenetic responses in punctured leaves

Types and concentrations of auxin ($\mu\text{g}/\text{l}$)	Mean number of root \pm SE		Mean fresh weight of callus \pm SE (μg)	
	Abaxial side	Adaxial side	Abaxial side	Adaxial side
2,4-D	0.01	— ^c	—	—
	0.05	1.2 \pm 0.4 ^a	948.2 \pm 169.8	—
	0.10	2.0 \pm 0.4	2303.0 \pm 490.4	—
	0.50	1.8 \pm 0.5	1370.4 \pm 126.4	—
	1.00	—	1137.8 \pm 121.7	137.8 \pm 24.0
	1.50	—	1001.4 \pm 90.6	145.2 \pm 10.5
	2.00	—	953.4 \pm 82.7	289.2 \pm 42.0
	2.50	—	944.0 \pm 88.7	626.0 \pm 52.0
	3.00	—	808.0 \pm 41.2	132.0 \pm 20.2
	3.50	—	706.4 \pm 51.6	—
NAA	0.01	0.4 \pm 0.4	—	—
	0.05	4.0 \pm 0.7	—	—
	0.10	9.8 \pm 1.2	—	—
	0.50	103.6 \pm 7.1	11.8 \pm 1.0	—
	1.00	47.8 \pm 3.9	54.2 \pm 3.2	—
	1.50	33.7 \pm 4.4	75.0 \pm 4.4	44.0 \pm 8.0
	2.00	24.5 \pm 2.2	22.3 \pm 7.2	1226.0 \pm 33.4
	2.50	12.0 \pm 0.6	34.8 \pm 4.6	607.7 \pm 82.5
	3.00	7.5 \pm 0.5	40.5 \pm 0.9	180.0 \pm 43.4
	3.50	3.0 \pm 3.0	12.4 \pm 2.0	54.0 \pm 0.9
IAA	0.01	—	—	—
	0.05	—	1.2 \pm 0.6	—
	0.10	0.4 \pm 0.2	1.2 \pm 0.4	—
	0.50	0.6 \pm 0.4	1.8 \pm 0.4	—
	1.00	2.2 \pm 0.4	1.2 \pm 0.3	—
	1.50	3.2 \pm 0.4	1.6 \pm 0.3	—
	2.00	4.0 \pm 1.0	2.6 \pm 0.4	—
	2.50	4.8 \pm 1.0	2.0 \pm 0.5	—
	3.00	1.4 \pm 0.5	3.4 \pm 0.4	—
	3.50	0.6 \pm 0.4	1.0 \pm 0.3	—
IBA	0.01	0.4 \pm 0.4	—	—
	0.05	0.2 \pm 0.2	—	—
	0.10	1.0 \pm 0.6	3.8 \pm 0.7	—
	0.50	3.4 \pm 1.0	2.0 \pm 0.7	—
	1.00	12.0 \pm 1.5	15.8 \pm 1.2	—
	1.50	16.2 \pm 3.6	13.6 \pm 1.3	—
	2.00	18.8 \pm 1.4	14.8 \pm 1.3	—
	2.50	18.2 \pm 3.7	24.8 \pm 2.7	—
	3.00	13.2 \pm 4.0	36.0 \pm 4.6	—
	3.50	42.0 \pm 2.0	40.6 \pm 4.1	—
Con	—	—	—	—

^a Each value represents the mean \pm SE of 5 replications (after 6 weeks in culture)

^b Abbreviations : 2,4-D ; dichlorophenoxyacetic acid, NAA ; naphthalen acetic acid, IAA ; indole kactic acid, IBA ; indolebutric acid, Con ; control (lacking growth hormone)

^c — sign; no response

發生을 보였다.

IBA의 反應도 10개 처리구 모두 뿌리만 發生하였으며, IAA보다는 전반적으로 많은 수가 發生하여 2.0 $\mu\text{g}/\text{l}$ 처리구에서 18.8개의 發根數를 보였다.

Auxin 効果는 2,4-D의 添加에서 약간의 뿌리 發生을 보였으나, Callus의 旺盛한 生長을 나타냈고, NAA는 高濃度에서 Callus 發生이 나타나

기는 했으나 어느 Auxin 처리보다 旺盛한 뿌리 發達을 보였다. IAA와 IBA는 Callus 發生이 전혀 없었으며, 뿌리만 發生하여 Auxin 종류에 따른 分化特性이 있음을 確認할 수 있었다 (Plate-1,2,3).

葉 뒷면이 培地위에 닿도록 하는 Abaxial 처리와 그 反對인 Adaxial 처리 간에는 Abaxial 처리가 Adaxial 처리보다는 훨씬 높은 反應을

Table 3. Effect of cytokinins on morphogenetic responses in punctured leaves

Types and concentrations of cytokinins ($\mu\text{g}/\text{l}$)		Mean number of shoot \pm SE					
		Abaxial side			Adaxial side		
BAP ^b	0.1	1.8	\pm	0.9 ^a	0.2	\pm	0.2
	0.2	2.2	\pm	0.9	0.2	\pm	0.2
	0.4	13.8	\pm	1.1	3.0	\pm	1.0
	0.6	18.2	\pm	5.5	72.4	\pm	13.8
	0.8	127.6	\pm	4.1	49.4	\pm	12.0
	1.0	70.0	\pm	8.9	27.6	\pm	5.3
	2.0	62.2	\pm	9.4	26.2	\pm	8.6
	3.0	54.4	\pm	9.9	23.4	\pm	6.4
	4.0	3.0	\pm	0.9	20.6	\pm	3.2
	5.0	0.6	\pm	0.4	8.0	\pm	1.0
Zip	0.1	—			— ^c		
	0.2	0.4	\pm	0.3	—		
	0.4	0.6	\pm	0.4	—		
	0.6	0.4	\pm	0.3	—		
	0.8	3.0	\pm	0.7	—		
	1.0	2.0	\pm	1.0	1.2	\pm	0.4
	2.0	3.2	\pm	1.0	0.6	\pm	0.4
	3.0	5.4	\pm	0.8	1.6	\pm	0.5
	4.0	16.2	\pm	1.2	1.0	\pm	0.5
	5.0	6.2	\pm	1.2	—		
Kn	0.1	—			—		
	0.2	—			—		
	0.4	—			—		
	0.6	1.6	\pm	0.3	—		
	0.8	2.2	\pm	0.4	—		
	1.0	5.0	\pm	0.7	0.8	\pm	0.4
	2.0	21.0	\pm	2.0	0.2	\pm	0.2
	3.0	2.4	\pm	0.9	0.8	\pm	0.4
	4.0	0.8	\pm	0.4	0.8	\pm	0.4
	5.0	—			—		
Zea	0.1	—			—		
	0.2	—			0.4	—	0.4
	0.4	33.0	\pm	6.1	—		
	0.6	26.4	\pm	3.1	14.0	\pm	1.2
	0.8	27.2	\pm	2.0	17.6	\pm	2.1
	1.0	95.6	\pm	10.0	11.4	\pm	5.0
	2.0	81.2	\pm	6.1	9.0	\pm	2.8
	3.0	66.6	\pm	6.5	67.9	\pm	3.0
	4.0	37.2	\pm	5.9	23.4	\pm	2.7
	5.0	29.4	\pm	2.0	10.2	\pm	1.0
Con	—			—			

^a Each value represents the mean \pm SE of 5 replications (after 6 weeks in culture)

^b Abbreviations : BAP ; 6-benzylamino purine, Zip : isopentenyl adenine, Kn ; Kinetin, Zea ; zeatin, Con ; control (lacking growth hormone)

^c —sign; no response

나타냈다.

표-3은 Cytokinin의單獨添加效果를 나타낸 것이다.

BAP, Zip, Kinetin, Zeatin의 4가지 生長調節物質의 처리에서 전부 줄기(shoot)만 發生하였으며 줄기의 發生數는 不定芽에 依한 大量増殖보다 훨씬 높은 増殖率을 나타냈다. 特히 BAP 0.

8mg/l 添加時 127.6個로 不定芽를 이용하여 大量増殖한 경우, BAP 0.1mg/l 의 14.4개 보다는 約 8倍의 増殖率을 나타냈다.

Zeatin의 경우, 濃度에 따른 變異가 거의 없이 増殖效果가 均一하게 나타났고, 10mg/l 경우 95.6개로 높은 増殖率을 보였다. Zip와 Kinetin은 濃度에 따른 變異가 심했으며, Zip는 高濃度인 4.0

mg/l 처리구에서 16.2개, Kinetin은 2.0mg/l 처리구에서 21.0개의 증식율을 나타내어 BAP나 Zeatin 처리구에 비해 매우 낮은 반응을 보였다.

Cytokinin의 처리효과는 Auxin처리에서와 마찬가지로 葉面을 위쪽으로 하여 置床한 Abaxial 처리가 Adaxial 처리보다 효과가 크게 나타났다.

Cytokinin의 종류에 따른 反應變化없이 모든 처리에서 全部 줄기(Shoot)만 形成되었으나, 줄기 成長率은, 배지에 添加한 Cytokinin의 種類와 濃도에 따라 큰 差異를 나타냈다.

3) 針자극에 對한 葉表面에서 發生한 組織의 顯微鏡的 觀察

葉面을 針으로 자극한 試料는 BAP 0.8mg/l 의 添加區에서 不定芽로부터 大量增殖시키는 方法보다 約 8배에 가까운 높은 증식율을 얻을 수 있었다. 여기에서 誘導된 個體의 發生過程을 顯微鏡的으로 관찰한 結果, 針으로 뚫어준 구멍 주위 組織에서 Callus가 形成되면서 再分化가 일어나서 個體가 發生된 것으로 推定 할 수 있었다(Plate-4, 5).

針으로 자극받은 주위의 細胞에서 Callus가 形成되어 生長하고 있었으며 이들 Callus에서 곧 바로 再分化가 일어나는 것을 관찰할 수 있었다. 상처난 부분의 組織은 배지에 密着되어 많은 영향을 받는 것으로 推測할 수 있었으며, 배지에 따라 일어나는 變異는 再分化된 個體의 遺傳的 特性을 變化시킬 수 있을것이다(Stavarek & Rains, 1985).

4) 器內挿木苗에 對한 NaCl 濃度別 反應 調査
不定芽에서 誘導된 大量增殖苗를 器內培養 狀態에서 NaCl 濃도에 對한 反應을 調査한 結果가

Table 4. Effect of various NaCl concentrations on shoot development

Concentrations of NaCl (mM)	Length of shoots(㎝) ± SE	
	After 4 weeks	After 8 weeks
0	5.4 ± 0.97 *	6.9 ± 0.35 **
10	4.9 ± 1.24	5.8 ± 0.37
20	4.0 ± 1.34	4.5 ± 0.15
30	3.9 ± 0.94	4.3 ± 0.12
40	4.0 ± 1.12	4.6 ± 0.07
50	4.0 ± 1.02	4.2 ± 0.32
60	3.5 ± 0.05	3.4 ± 0.03
70	3.4 ± 0.16	3.4 ± 0.03
80	3.4 ± 0.32	3.4 ± 0.09
90	3.4 ± 0.43	3.2 ± 0.03
100	3.4 ± 0.38	3.3 ± 0.03

* Each value represents the mean ± SE of 3 replications

** MS basal medium with non-phytohormone

표-4와 표-5이다.

표-4는 줄기 生長을 調査한 것으로 NaCl 濃도가 50mM까지는 4주후에 0.5㎝ 정도의 生長을 나타냈으며, 8주후에는 0.7㎝ 정도의 生長을 보였다. 그러나 60mM 이상 添加한 배지에서는 거의 成長이 中止되었다.

표-5는 뿌리의 發育狀態를 나타낸 것으로 50mM까지는 뿌리의 發育이 良好한 편이나 70mM에서 Table 5. Effect of various NaCl concentrations on root development

Concentrations of NaCl(mM)	Length of roots(㎝) ± SE	
	After 4 weeks	After 8 weeks
0	2.4 ± 0.72*	3.0 ± 0.58**
10	2.2 ± 0.34	2.5 ± 0.29
20	1.7 ± 0.25	2.0 ± 0.29
30	1.8 ± 0.42	2.0 ± 0.29
40	1.5 ± 0.26	1.7 ± 0.17
50	2.2 ± 0.43	2.5 ± 0.50
60	0.7 ± 0.63	1.2 ± 0.44
70	2.1 ± 0.50	2.5 ± 0.29
80	1.3 ± 0.17	1.8 ± 0.50
90	0.2 ± 0.16	0.4 ± 0.10
100	0.2 ± 0.32	0.6 ± 0.27

* Each value represents the mean ± SE of 3 replications

** MS basal medium with non-phytohormone

2.1㎝로 比較的 좋은 生育을 보이고 있는 것을 除外하면 高濃度에서는 發育이 極히 不良한 것으로 나타났다.

줄기와 뿌리의 生育狀態를 觀察한 結果 NaCl 濃도가 50mM 以上이 되면 심한 生育 저해 現象이 나타나서 生育이 不可能한 것으로 推定되었다.

NaCl의 濃도에 對한 反應은 植物體의 種類와 檢定組織에 따라 甚한 差異를 나타냈다. 非選拔 個體의 양황철의 경우 줄기와 뿌리의 成長이 50mM 以上에서 急激히 떨어짐을 觀察할 수 있었다.

배의 경우 Callus 誘發을 試圖한 結果 1.5% 以上의 NaCl 濃度에서는 甚한 저해 現象이 나타났으며 (Chae et al., 1987), Alfalfa의 경우 0.5% 의 NaCl에서 細胞生長이 中止되었고 (Stavarek & Rains, 1985), *Nicotiana tabacum*의 줄기 生長은 140mM에서부터 280mM 사이에서, 뿌리 生長은 70mM에서부터 140mM 사이에서 심하게 저해되는 것으로 報告되었다(Pau & Thorpe, 1986).

5) 針자극 葉表面에서 誘發된 幼苗에 對한 NaCl 耐性 個體 選拔

葉面을 針으로 찌어서 MS 基本培地에 BAP 0.8mg/l 를 添加한 후, NaCl 濃度를 10에서 100mM 까지 10배씩 증가시켜 添加한 배지에서 個體 發生狀態를 조사한 것이 表-6이다.

NaCl 無添加 培地에서 4주후에 57.3個의 많은 수의 個體가 發生한데 反해 10mM 처리구에서는 42.1개, 20mM에서는 31.4개, 30mM에서는 24.5개,

Table 6. Proliferation of shoots from punctured leaves grown on MS medium supplemented with BAP 0.8mg/l and various concentrations of NaCl

Concentrations of NaCl(mM)	Number of shoots per leaf \pm SE	
	After 4 weeks	After 8 weeks
0	57.3 \pm 4.21*	93.7 \pm 3.35
10	42.1 \pm 3.68	52.7 \pm 3.18
20	31.4 \pm 3.52	44.0 \pm 2.65
30	24.5 \pm 4.12	33.3 \pm 2.40
40	22.5 \pm 2.67	26.3 \pm 3.48
50	5.3 \pm 2.12	15.7 \pm 1.20
60	6.3 \pm 0.67	19.3 \pm 0.33
70	6.5 \pm 1.24	18.0 \pm 2.08
80	4.3 \pm 0.65	13.7 \pm 2.03
90	2.1 \pm 0.54	10.7 \pm 2.03
100	1.2 \pm 0.74	8.3 \pm 1.45

* Each value represents the mean \pm SE of 3 replications

40mM에서는 22.5개로 점차 감소하다가 50mM 이상 부터서는 急激히 減少하여 50mM에서 5.3개, 60mM에서 6.3개, 70mM에서 6.5개, 80mM에서 4.3개, 90mM에서 2.1개, 100mM에서는 1.2개로 減少하였다. 그러나 50mM 이상에 接種한 葉은 대부분이 葉綠素가 破壞되었으나 針으로 찌어 준 部分에서는 個體 發生이 觀察되었다.

8週後에는 NaCl 無添加 培地에서 93.7個로 많은 수의 個體가 發生한 것에 비해 NaCl 添加 배지에서의 發生個體數는 적은 편이었으나, 4주후 結果에 比해서는 많은 個體가 發生하였다.

4주후에는 NaCl 濃度가 50mM 以上인 처리구에서 個體數가 急激히 減少하였으나, 8주후에는 회복세가 빨라져서 40mM 26.3개, 50mM 15.7개, 60mM 19.3개, 70mM 18.0개, 80mM 13.7개, 90mM 10.7개, 100mM 8.3개의 個體 發生率을 나타냈다. 여기에서 發生된 새로운 個體들은 原來培地에 添加된 NaCl 濃度와 그 이상의 水準으로 處理한 다음, NaCl 耐性力을 調査한 結果 50mM에서 選拔된 Shoot를 50mM에 移植한 處理區에서는 正常的인 生育을 보인 反面, 50mM에서 選拔된 Sh-

oot를 그 以上の 濃度에 接種한 處理區와 50mM 以上에서 選拔된 줄기를 같은 濃度 및 그 以上の 濃度에 接種하였을 때에는 生長이 정지하는 것을 관찰할 수 있었다.

따라서 針으로 자극한 葉을 使用하여 一次的으로 내염성 個體를 選拔할때에 最適 NaCl 濃度는 50mM 임을 推定할 수 있었다. 50mM에서 일정 기간 동안 成長 시킨 다음, 이 試料를 利用하여 2次 選拔을 爲한 實驗이 必要的 것으로 생각되었었다.

一次 選拔個體의 全體的인 發根狀態는 高濃度 處理에서 나온 것일수록 不良한 경향을 나타냈으며, 發根 培地로써 生長調節物質이 添加되지 않은 1/2MS 基本배지로 옮긴 후 30日이 지나서 調査한 結果 10mM 처리구와 20mM 처리구에서는 100%, 30mM 처리구에서는 60%, 40mM 처리구에서는 40%, 50mM 처리구에서는 20%의 發根率을 나타냈으나 그 以上の 濃度에서는 發根이 되지않았다.

Table 7. Effect of various NaCl concentrations on root formation after 30 days in culture

Experiment set	Concentrations of NaCl(mM)	Rooting efficiency(%)
N 1	10	100
N 2	20	100
N 3	30	60
N 4	40	40
N 5	50	20
N 6	60	0
N 7	70	0
N 8	80	0
N 9	90	0
N10	100	0

Pau등 (1985)의 담배의 發根 實驗에 있어서도 0.75~1.0%의 Na_2SO_4 를 添加한 배지에서 16번 계대배양한 이후에야 發根이 되었음을 보고한 것에 比較하면 發根을 위해 더 많은 시간이 必要的 것으로 思料된다.

培養器에 接한 細胞의 變異는 培地 環境條件에 따라 일어나며 이들은 對象耐性物質에 따라 次代에 계승된다고 報告된 바 있다(Ojima and Ohira, 1983).

Ojima 와 Ohira (1983)는 당근 배양細胞에서 Aluminum濃度의 傾斜培地에 따라 選拔된 細胞에서 再分化된 個體가 같은 程度의 耐性을 가지고 있는 것으로 밝혀내어 器內選拔 可能性을 시

사한 바 있다.

耐塩性に 關한 研究은 담배(Pau *et al.*, 1985), 벼(Chae, 1987; Nam, 1985) 등에서 비슷한 結果를 報告한 바 있다.

林木의 경우 Park (1984)은 소나무 5개 樹種에 對한 耐塩性を 胚培養法에 依해 樹種間 變異를 報告한 바 있으며, McCormick (1978)은 6個 수종에 對한 Aluminum耐性を 調査 報告한 바 있다.

Gorham *et al.*, (1986)는 *Cicer arietinum*의 耐塩性 Callus 系統에서 Proline 含量이 增加됨을 報告했고, Wyn (1985)은 Glycinebetain의 含量과 耐塩성이 關聯이 있으며, 이들 物質分析에 依한 選拔 可能性을 推定하였다.

結 論

葉表皮細胞를 針으로 자극하여 NaCl의 농도에 傾斜變異를 준 培地에 培養하여 發生한 個體를 選拔함으로써 耐塩성이 높은 個體 選拔의 可能性을 檢討하였다.

非選拔 器內挿木에서는 50mM 以上の NaCl의 添加 培地에서는 生育이 거의 中止되었다. 그러나 針으로 자극한 葉組織에서는 50mM 以上에서 枯死하지 않고 多量의 새로운 個體가 發生하였으며, 이들 個體는 원래 배지에 添加한 NaCl보다 높은 濃度에서도 生育이 지속되었으며 耐塩性を 갖는 것으로 사료되었다.

高濃度 塩分에 적응하는 細胞는 非選拔細胞보

다 NaCl添加 배지에서 生長이 더 旺盛하였다(Benzel *et al.*, 1985).

本 研究結果 組織培養法을 利用한 無機塩類 耐性에 對한 器內選拔法은 다루기 힘들고, 生育期間이 매우 긴 林木에 있어서도, 利用 可能性이 있음을 展望할 수 있었다.

摘 要

포푸라(양황철)의 器內培養에서 大量增殖한 遺傳的으로 均一한 試料를 利用, NaCl耐性を 檢定한 結果 50mM이 生育限界임을 밝혀냈다.

葉表皮를 針으로 뚫어 MS 基本培地에 Auxin과 Cytokinin의 效果를 檢定한 結果 Cytokinin에서는 많은 個體가 發生하였으며 特히 BAP 0.8 mg/l에서는 127.6개의 많은 個體가 發生하였다. NaCl 耐性個體 選拔을 爲해 같은 培地에 NaCl 10mM부터 100mM까지 10단계로 處理하여 針으로 자극한 試料를 接種한 結果 50mM 以上에서도 13.7~15.7개의 여러가지 個體를 얻었다. 特히 90mM에서 10.7개 100mM에서도 8.3개의 個體를 얻었다. 非選拔 個體는 50mM 以上の NaCl 添加 배지에서 生長이 完全히 中止된 反面에 器內選拔 個體는 高濃度 NaCl의 계대배양에서도 生長을 계속하였다.

以上の 結果에서 林木에 있어서도 器內培養法을 利用하여 耐性 個體를 選拔할 수 있는 可能性을 推定할 수 있었다.

引用 文 獻

1. Ben-Hayyim, G. and Kochba, J. 1983. Aspects of salt tolerance in a NaCl-selected stable cell line of *Citrus sinensis*. *Plant Physiology* 72 : 685-690.
2. Binzel, M.L., Hasegawa, P.M., Handa, A.K. and Bressan, R.A. 1985. Adaptation of tobacco cells to NaCl. *Plant Physiol.* 79 : 118-125.
3. Chae, Y.A., Chung, J., Heu, J.K. and Lee, J.W. 1987. Effects of NaCl on callus in rice. *Recent Progress in Molecular Biology and Genetic Engineering in Korea*. The Institute for Molecular Biology and Genetics, Seoul National University. pp 369-378.
4. Chun, Y.W., Richard, B.H. and Loren, C.S. 1986. Influences of medium consistency and shoot density on *in vitro* shoot proliferation of *Populus alba* × *grandidentata*. *Plant Cell Tissue and Organ Culture* 5 : 179-185.
5. Epstein, E., Kingsbury, R.W., Norlyn, J.D. and Rush, D.W. 1974. Production of food crops and their biomass by seawater cult-

- ure. p77-79. In A. Hollaender (de.) The bisaline concept. Plenum Pub Co. New York.
- Mc-Guire, P.E. and Dvork, J. 1981. High salt-tolerance potential in wheatgrasses. *Crop Sci.* 21 : 702-805.
6. Gorham, J., Forster, B.P., Budrewicz, E., Wyn Jones R.G., Miller, T.E. and Law, C.N. 1986. Salt tolerance in the *Triticeae* : Solute accumulation and distribution in an amphidiploid derived from *Triticum aestivum* cv. Chinese spring and *Thinopyrum bessarabicum*. *Journal of Experimental Botany* 37 : 1435-1449.
 7. Gorham, J., Budrewicz, E., McDonnell, E. and Wyn Jones R.G. 1986. Salt tolerance in the *Triticeae* : Salinity-induced changes in the leaf solute composition of some perennial *Triticeae*. *Journal of Experimental Botany* 37 : 1114-1128.
 8. Nam, L.S. and Heszky, L.E. 1985. Testing of salt/NaCl/tolerance and regeneration in callus culture/n, 2n/of rice. *Genetic Manipulation in Plant Breeding*. Editors Horn, W. *et al.* de Gruyter pp.617-619.
 9. McCormik, L.H. and Steiner, K.C. 1978. Variation in aluminum tolerance among six Genera of trees. *Forest Sci.* 24 : 565-568.
 10. Ojima, K. and Ohira, K. 1983. Characterization of aluminum and manganese tolerant cell lines selected from carrot cell cultures. *Plant and Cell Physiol.* 24 : 789-797.
 11. Park, Y.G. 1984. Variation in salt-tolerance among five species in Genus *Pinus* by means of *in vitro* techniques. *Korean Journal of Plant Tissue Culture* 11 : 1-4.
 12. 朴龍求, 1986. 林木育種과 組織培養. 경북대학교40주년 기념 Symposium 특집호 : 113-135.
 13. Park, Y.G. and Han, K.H. 1986. Isolation and culture of mesophyll protoplasts from *in vitro* cultured *Populus alba* × *P. glandulosa*. *Jour. Korean For. Soc.* 73 : 33-42.
 14. Park, Y.G., Son, S.H., Shin, D.I. and Woo, J.H. 1986. Isolation and aggregation of protoplasts in higher plant - Factors affection the isolation of mesophyll protoplast form *Populus euramericana* cv. I-214 - *Bulletin of Institute of Genetic Engineering* 1 : 35-42.
 15. Park, Y.G. and Woo, J.H. 1989. Tissue culture of *Robinia pseudoacacia* L. *Jour. Korean For. Soc.* In press.
 16. Pau, E.C., Ragolsky, E., Chandler, S.F. and Thorpe, T.A. 1985. Retention of shoot regeneration capacity of tobacco callus by Na₂SO₄. *Plant Cell Reports* 4 : 225-228.
 17. Pau, E.C. and Thorpe, T.A. 1986. The effect of various salts on multiplication of *Nicotiana tabacum* L. shoot cultures of different Na₂SO₄ tolerance. *J. Plant Physiol.* 124 : 465-472.
 18. Seeni, M.M., Fowke, L.C. and King, J. 1985. The isolation and cultivation of protoplasts from cell suspensions of a pantothenate-requiring auxotroph of *Datura*. *Can. J. Bot.* 63 : 779-783.
 19. Shannon, M.C., McCreight, J.D. and Draper, J.H. 1983. Screening tests for salt tolerance in lettuce. *J. Amer. Soc. Hort. Sci.* 108 : 225-230.
 20. Stavarek, S.J. and Rains, D.W. 1985. Effect of salinity on growth and maintenance costs of plant cells. *Cellular and Molecular Biology Plant Stress.* 129-143. Editors Key, J.L. and Kosuge, T. Alan R. Liss, Inc., New York.
 21. Vanlerberghe, G.C. and Brown, L.M. 1986. Inhibitor of cell division by proline analogues : Resversal by proline and high salinity. *J. Plant Physiol.* 123 : 229-239.
 22. Wyn, Jones R.G. and Gorham, J. 1983. Aspects of salt and drought tolerance in higher plants. *Genetic Engineering of Plants. An Agricultural Perspective.* Edited by Tsune Kosuge, Carole P. Meredith and Alexander Hollaender Plenum Press. pp. 355 -

Plate Legends

Plate 1. Callus formation from punctured leaf surface on MS basal medium with 2, 4-D 0.1 mg/l after 30 days cultured

Plate 3. Shoot buds derived punctured leaf surface (abaxial side) on MS basal medium with BAP 0.8 mg/l after 30 days cultured

Plate 5. Shoot development on non-phytohormone MS medium with various concentrations of NaCl treated medium (non-NaCl (Control), 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 100mM NaCl ; Right to left)

Plate 7. The growth of shoots derived from punctured leaf surface on MS basal medium with BAP 0.8 mg/l and 50mM NaCl (cultured 5 days, 10, 15, 20, 25, 30 and 35 days ; Right to left)

Plate 2. Multiple roots inducted from punctured leaf surface on MS basal medium with NAA 0.5 mg/l after 30 days cultured

Plate 4. Microscopical investigation of vertical section of punctured leaf callus tissue (bar=0.05 mm)

Plate 6. Multiple shoots initiation from punctured leaf on MS basal medium with BAP 0.8 mg/l and various concentrations of NaCl after 8 weeks cultured

Plate 8. Habituation of plantlets derived from *in vitro* cultured shoots in green house

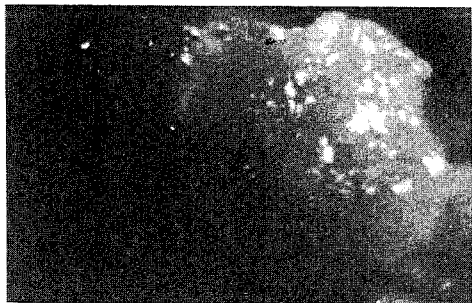


Plate 1.

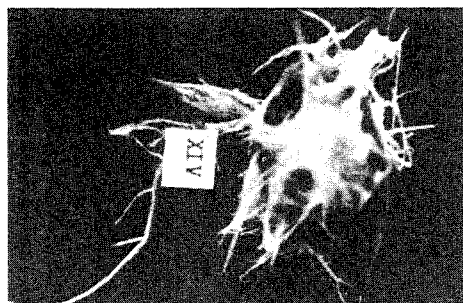


Plate 2.



Plate 3.

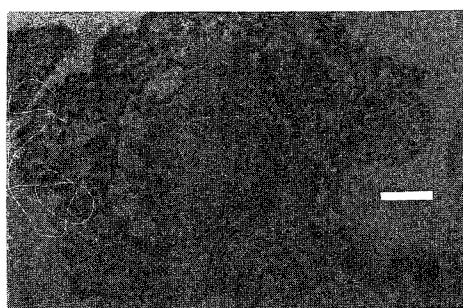


Plate 4.

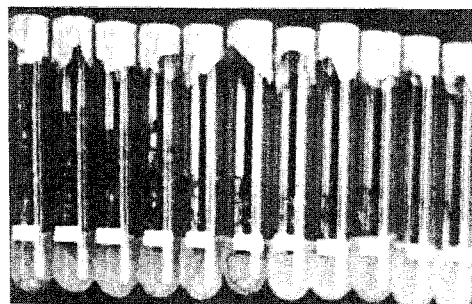


Plate 5.

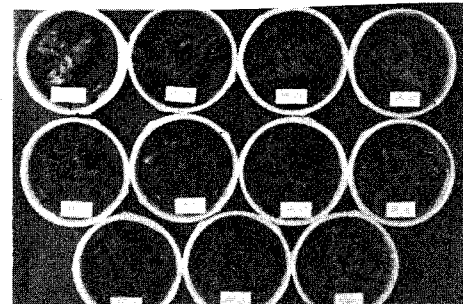


Plate 6.

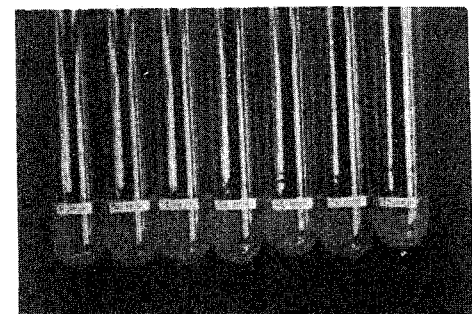


Plate 7.



Plate 8.